

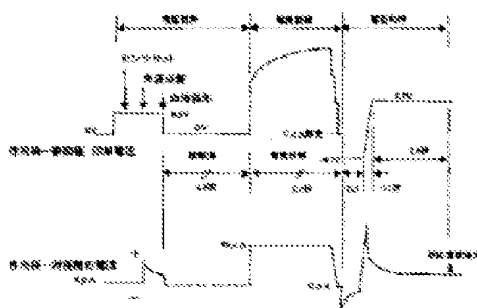
**REACTION-CURRENT MEASURING METHOD BY ENZYME ELECTRODE**

**Patent number:** JP2002189015  
**Publication date:** 2002-07-05  
**Inventor:** TAKAHASHI MASAOKI; KONNO TADAMORI;  
SUNAMURA KATSUYUKI  
**Applicant:** SANKYO CO  
**Classification:**  
- international: **G01N27/416; G01N27/327; G01N27/416; G01N27/327;**  
(IPC1-7): G01N27/416; G01N27/327  
- european:  
**Application number:** JP20000387276 20001220  
**Priority number(s):** JP20000387276 20001220

Report a data error here

**Abstract of JP2002189015**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a reaction-current measuring method with measurement accuracy and satisfactory reproducibility, in which measuring time is shortened. **SOLUTION:** Through the use of a three-electrode-type enzyme electrode, constituted of a working electrode, a reference electrode, and a counter electrode for measuring the concentration of a specific substance in a liquid to be tested, (a) it is detected that the liquid to be tested to be measured is dropped to the enzyme electrode, (b) an enzyme membrane of each electrode is made to swell, (c) a prescribed current is passed between the working electrode and the counter electrode to electrolyze moisture in the liquid to be tested, (d) a voltage is increased to the oxidation potential of hydrogen peroxide with time and impressed between the reference electrode and the working electrode, and held at the electrochemical oxidation potential for a predetermined time, and then a reaction current passing between the working electrode and the counter electrode is measured in the reaction current measuring method.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-189015  
(P2002-189015A)

(43) 公開日 平成14年7月5日(2002.7.5)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/416

G 0 1 N 27/46

3 3 6 B

27/327

27/30

3 3 3 F

3 3 3 B

27/46

3 3 6 C

3 3 8

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2000-387276(P2000-387276)

(71) 出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(22) 出願日 平成12年12月20日(2000.12.20)

(72) 発明者 高橋 正昭

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72) 発明者 紺野 忠盛

東京都中央区銀座2丁目7番12号 三共株式会社内

(72) 発明者 砂村 克之

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(74) 代理人 100103647

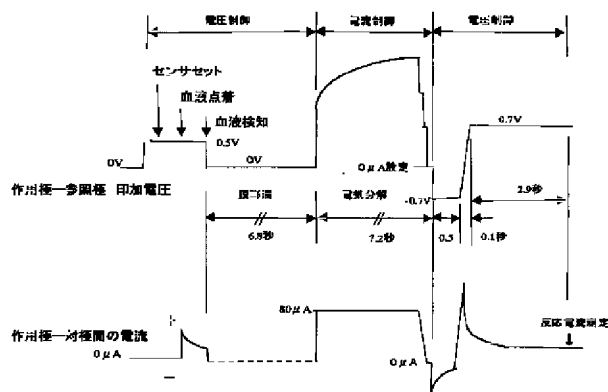
弁理士 小栗 昌平 (外4名)

(54) 【発明の名称】 酵素電極による反応電流測定方法

(57) 【要約】

【課題】 測定の正確さや再現性は勿論のこと、測定時間が短縮された反応電流測定方法を提供する。

【解決手段】 被検液中の特定物質の濃度を測定するために、作用極、参照極及び対極で構成される3電極方式の酵素電極を用い、a) 測定する被検液が酵素電極に点着されたことを検出し、b) 各電極の酵素膜を膨潤させ、c) 作用極と対極との間に所定電流を通电して被検液中の水分の電気分解を行い、d) 参照極と作用極との間に過酸化水素の酸化電圧まで電圧を時間とともに上昇させて印加し、前記電気化学的酸化電圧に所定時間保持した後、作用極と対極との間に流れる反応電流を測定する反応電流測定方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検液中の特定物質の濃度を測定するために、作用極、参照極及び対極で構成される3電極方式の酵素電極を用い、酵素反応により生成した過酸化水素の酸化に伴う反応電流を測定する方法において、

- a) 測定する被検液が酵素電極に点着されたことを検出し、
- b) 各電極の酵素膜を膨潤させ、
- c) 作用極と対極との間に所定電流を通电して被検液中の水分の電気分解を行い、
- d) 参照極と作用極との間に過酸化水素の電気化学的酸化電圧まで電圧を時間とともに上昇させて印加し、前記電気化学的酸化電圧に所定時間保持した後、作用極と対極との間に流れる反応電流を測定する、工程を含むことを特徴とする反応電流測定方法。

【請求項2】 前記工程c)と工程d)との間に、電気分解により発生した酸素ガス及び水素ガスによる泡沫を安定化させる工程を挿入することを特徴とする請求項1記載の反応電流測定方法。

【請求項3】 前記工程d)において、電気化学的酸化電圧まで電圧を直線的に上昇させて印加することを特徴とする請求項1または2に記載の反応電流測定方法。

【請求項4】 前記工程d)において、電気化学的酸化電圧まで電圧を曲線的に上昇させて印加することを特徴とする請求項1または2に記載の反応電流測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

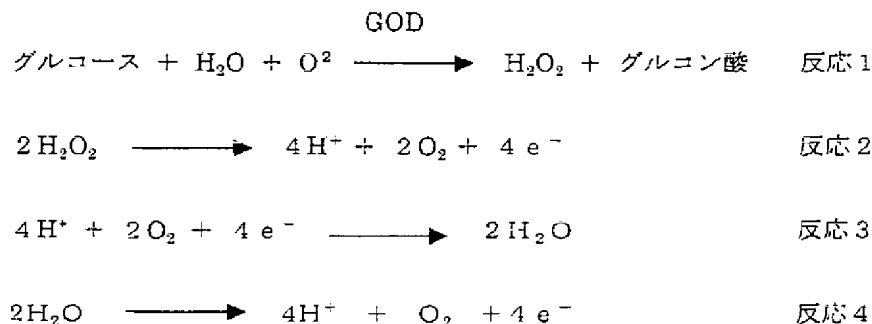
【発明の属する技術分野】本発明は、被検液中の特定物質の濃度を測定するために、酵素反応に伴って発生する過酸化水素の酸化反応に伴う電流（以下、「反応電流」という）を測定する方法に関する。特に、測定精度の向上と測定時間の短縮とを図り、例えば、糖尿病患者が自宅で自己の血糖値を測定するために使用される簡易式血糖値測定装置に適した反応電流測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血液等被検液中のグルコースを分析する手段として、グルコースオキシダーゼを親水性高分子により白金電極表面に包括固定した、所謂「酵素電極」が使用されている。この酵素電極上では、下記反応1～反応4に示すように、被検液中のグルコース濃度はグルコースオキシダーゼ（GOD）の触媒作用により酵素反応が起こり、反応1において、被検液中のグルコース濃度に比例した過酸化水素（ $H_2O_2$ ）が生成される。この過酸化水素は白金電極の作用極表面で酸化（反応2、反応3）されることから、そのときの作用極と対極間の電流（反応電流）を検知することで、予め用意されたグルコース濃度対反応電流値の検量線から被検液中のグルコース濃度を算出することができる。

【0003】

【化1】



【0004】また、酵素電極は、作用極と対極とから成る2電極が一般的であるが、酵素電極を作製する際に生ずる酵素電極個体差の影響の排除や測定精度の向上等を目的として、作用極と対極の他に参照極を用いた3電極構造（図1参照）も採用されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】ところで、簡易式血糖値測定装置においては、患者自身や医療関係者が毎日血糖値を測定しなければならないことから、測定の正確さや再現性に加えて、測定時間の短縮が強く要望されている。

【0006】しかし、従来の簡易式血糖値測定装置では、過酸化水素を酸化するための電気化学的酸化電圧（以下、「酸化電圧」という）の印加に際して、比較的レートの低い傾斜電圧を印加し、それに反応した電流ピ

ーク、あるいは一定時間後の反応電流を検出しているが、このような手法を白金電極を用いた酵素電極に適用すると、電流ピーク検出では測定精度が十分に満足されず、また、傾斜電圧レートが低いことから測定時間も長くなっている。

【0007】また、保存のために酵素膜は乾燥した状態で電極上に担持されているため、被検液のグルコース濃度を分析する際、被検液中のグルコースと乾燥状態の酵素膜中にあるグルコースオキシダーゼとを被検液中の水分で充分湿らせて膨潤させ、酵素反応を起こさせる必要がある。このように、膨潤並びに上記した電圧印加手法が測定に時間を要している主要因となっており、従来の一般的な簡易式血糖値測定装置では、測定終了までに概ね30秒以上要している。

【0008】また、採取血液の量をより少なくすること

も要求されており、そのためには検出感度を高めて低濃度のグルコースでも正確に測定できるようにする必要がある。

【0009】本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、測定の正確さや再現性は勿論のこと、測定時間が短縮された反応電流測定方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、被検液中の特定物質の濃度を測定するために、作用極、参照極及び対極で構成される3電極方式の酵素電極を用い、酵素反応により生成した過酸化水素の酸化に伴う反応電流を測定する方法において、

- a) 測定する被検液が酵素電極に点着されたことを検出し、
- b) 各電極の酵素膜を膨潤させ、
- c) 作用極と対極との間に所定電流を通電して被検液中の水分の電気分解を行い、
- d) 参照極と作用極との間に過酸化水素の電気化学的酸化電圧まで電圧を時間とともに上昇させて印加し、前記電気化学的酸化電圧に所定時間保持した後、作用極と対極との間に流れる反応電流を測定する、工程を含むことを特徴とする反応電流測定方法を提供する。

【0011】また、本発明は、前記工程c)と工程d)との間に、電気分解により発生した酸素ガス及び水素ガスによる泡沫を安定化させる工程を挿入することを特徴とする上記反応電流測定方法を提供する。

【0012】また、本発明は、前記工程d)において、電気化学的酸化電圧まで電圧を直線的に上昇させて印加することを特徴とする上記反応電流測定方法を提供する。

【0013】また、本発明は、前記工程d)において、電気化学的酸化電圧まで電圧を曲線的に上昇させて印加することを特徴とする上記反応電流測定方法を提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明に関して図面を参照して詳細に説明する。

【0015】本発明においては、酵素電極は、図1にその上面図として示すように、作用極1と対極2との中央に参照極3を配した3電極構造を採用している。各電極は何れも公知の構成で構わず、例えばガラスエポキシ基板10に設けられた電極形成部11に、メッキ等により白金電極を所定形状に成膜し、その上に酵素膜を担持させ、更にその上に血球分離膜を積層して概略構成される。

【0016】2電極構造では、電極の分極も含めて個々の電極の均一性が異なると、過酸化水素を酸化するための酸化電圧が正確に印加されないという問題が発生し、このことは、再現性の低下につながる可能性が高い。し

かし、実際には電極作成時における膜液のコントロール精度あるいは保存状態等により、厳密には個々の酵素電極の膜質(膜厚、膜の吸湿程度等)が異なっていることが多い。そこで、本発明においては、参照極3を用いた3電極法を採用する。

【0017】また、各電極は、例えば図2に示される測定回路4に接続される。この測定回路4において、符号41は電位測定用増幅器であり、正端子に作用極1が接続され、負端子に参照極3が接続されている。符号42はボルテージフォロワー型増幅器であり、正端子には端子T1を通じて外部から電極への電圧及び電流の指示信号が印加され、負端子にはスイッチSW1が接続されている。また、このボルテージフォロワー型増幅器42の出力端子には作用極1が接続されている。対極2は、符号43で示される電流測定用増幅器の負端子に接続されている。電流測定用増幅器43はフィードバック回路44を備えており、このフィードバック回路44は、ツェナーダイオード45と抵抗Rsとが直列に挿入され、これと並列に抵抗Rpが挿入され、更にスイッチSW2を介してフィードバック抵抗Riが並列に挿入されている。また、電流測定用増幅器43の出力端子は、抵抗Raを介して反転増幅器46に接続されている。反転増幅器46の出力端子には抵抗Ri1、抵抗Ri2が直列に接続されており、両抵抗を分配するようにスイッチSW1の一方の端子aと接続されている。また、反転増幅器46の出力端子からは、端子T2を通じて測定電流が電圧の形態で出力される。

【0018】また、端子T1及び端子T2は、図示は省略される制御回路に接続しており、制御回路では下記に示す測定チャートの各工程における上記電気回路4の動作の制御や、測定結果の表示等を行う。

【0019】また、本発明においては、反応電流を測定する際に、作用極1と参照極3との間の電圧を制御して過酸化水素の酸化電圧を印加する。しかし、このとき過渡的な電流変化が極めて大きく、電流測定分解能を上げようとすると、電流測定用増幅器43が飽和する。そこで、上記測定回路4において、電流測定分解能を下げずに電流測定用増幅器43の飽和を回避し、かつ電極間に流入する電流に影響を与えずに電流測定が可能となるように、フィードバック回路44にツェナーダイオード45と直列に抵抗Rs、更に並列に抵抗Rpを挿入してある。ここで、抵抗Rsよりも抵抗Rpを数段大きく設定しておくことにより、電流測定用増幅器43のフィードバック抵抗は、電流測定用増幅器43への流入電流と抵抗Rsとの積がツェナー電圧を超えるまではほぼ抵抗Rpとなり、ツェナー電圧を越えた後はほぼ抵抗Rsとなる。従って、ツェナー電圧を越えた後の電流測定分解能を低くし、電流測定用増幅器43の飽和を避けることができる。また、電流測定用増幅器43から流出する負の電流については、抵抗Rsと抵抗Rpとによる並列抵抗がフィ

ードバック抵抗として作用するため、負極性電流測定時の飽和を避けることができる。尚、ツェナー電圧は電流測定用増幅器43の増幅特性が保証される電圧以下に設定されなければならない。また、反応電流の測定は抵抗 $R_p$ で作用するため、電源電圧および電流分解能の両方を考慮して設定する必要がある。

【0020】また、作用極1と参照極3との間の電圧を制御して印加する電圧制御回路と、作用極1と対極2との間に流れる電流を一定にする定電流回路とを共用し、その切り換えをスイッチSW1で行う。両回路を共用することにより、電子部品の点数を減少させ、例えば、電気回路の消費電力を少なくすることにより電源に用いる電池の寿命を伸ばすことができ、また、電子回路部を小型化できる利点を有する。

【0021】そして、電圧制御回路では、スイッチSW1の端子bを接続状態とし、ボルテージフォロワー型増幅器42の正端子(+)と電圧制御信号とが同じ電圧になるように追従して動作させる。これにより、作用極1と参照極3との間の電圧は端子T1から入力する電圧に比例して制御されることになる。一方、定電流回路では、スイッチSW1を端子aに切り替えてボルテージフォロワー型増幅器42の正端子(+)電圧に追従して電流測定用増幅器43及び反転増幅器46の出力が決まり、それにより、端子T1から入力する電圧に追従して作用極1と対極2との間に流れる電流が決まる。このとき、スイッチSW2を接続状態にすることにより電流測定用増幅器43のフィードバック抵抗 $R_i$ を小さくし、後段の反転増幅器46の増幅率を抵抗 $R_a$ と抵抗 $R_b$ との比で決定し、更にその出力を抵抗 $R_{i1}$ と抵抗 $R_{i2}$ とで分圧することにより、定電流制御におけるダイナミックレンジを大きくすることができる。これにより、電流測定用増幅器43を飽和させることなく、グルコース濃度換算値20~600mg/dlの測定が可能となる。

【0022】反応電流の測定は、以下に示す工程に従い行う。尚、図3にこれら工程のチャート図を示す。

(工程1：被検液点着の検出)測定装置を起動した後、被検液を酵素電極に点着する。このとき、被検液が酵素電極上に点着されたか否かの検知を行う。この検知は、予め作用極1と参照極3との間に0.1~0.5V程度の電圧を印加しておき、被検液点着により作用極1と対極2との間に0.01~0.1 $\mu$ A/秒以上の電流が検知されたとき、すなわち図2の端子T2から出力される前記電流値に相当した電圧値に達したときに被検液が点着されたとみなす。そして、被検液検知後は、作用極1と参照極3に印加している電圧が再び0Vになるように電圧調整を行う。尚、被検液の点着量は2~5 $\mu$ l程度である。

【0023】(工程2：膜膨潤)酵素電極では、血球分離膜に含まれるリン酸緩衝液等及び酵素膜に含まれるグルコースオキシダーゼ等は乾燥状態で保存されているため、被検液が血球分離膜上に導入されても直ちに反応し

ない。そこで、血液とこれらの物質が十分に馴染み合うまでの時間を数秒間(例えば1~10秒程度)設ける。この時の作用極1と参照極3との間の電位は、0Vに維持される。また、このとき、作用極1と対極2との間に流れる電流は0 $\mu$ Aとは限らず、前記被検液点着時に印加した電圧により、酵素電極が電荷を蓄積した場合、また、被検液自身が電荷を持っている場合、あるいは、電極に分極が生じている場合には、その電位に依存した微小電流が流れることになり、前記条件下でこの時間を設けることにより酵素電極の電位が安定する。尚、図3では、この微小電流を考慮して、作用極-対極間の電流を点線で示してある。

【0024】尚、以上の被検液点着(工程1)及び膜膨潤(工程2)は、図2のスイッチSW1の端子がbの状態にある、電圧制御回路にて行う。

【0025】(工程3：水分の電気分解)作用極1と参照極3との間の電圧を制御することにより、作用極1と対極2との間に一定の電流を所定時間通電して被検液中に含まれる水分の電気分解を行う。これは、白金電極と酵素膜との界面から微小の泡状酸素ガス及び水素ガスを発生させ、酵素反応をより短時間に効率的に行わせて、例えば、グルコース濃度に依存した過酸化水素濃度に至らしめるためである。また、酵素反応において、血液中の溶存酸素以上の酸素が必要な場合、作用極1にて発生した酸素が効率良く使われる。尚、この水分の電気分解は、例えば20~100 $\mu$ Aの電流を3~20秒間通電すればよい。また、水分の電気分解を終了する際は、一定の電流値から好ましくは時間と電流値の関係を段階的に減少させて0 $\mu$ Aになるように制御し、この0 $\mu$ Aの状態を0.05~0.2秒程度保持する。

【0026】尚、この電気分解は、図2のスイッチSW1の端子がaの状態にある、定電流制御回路にて行う。

【0027】(工程4：休止時間)上記工程3による水の電気分解を行った後、作用極1上に発生した酸素ガス及び対極2に発生した水素ガスの泡沫同士の結合による変動を安定化し、それに伴い、電極電位の変動が安定化すること、また、電気分解時に行う定電流制御から終了後の電圧制御への切り替え時の電流変動を軽減し、これによって変動する被検液の電位を安定化するための時間を設ける。このとき、作用極1及び参照極3は、例えば0V~-0.7Vの範囲内で、一定の電圧で制御され、休止時間は例えば0.3~1秒で充分である。

【0028】(工程5：反応電流の測定)上記工程2、工程3、工程4で生成した過酸化水素を作用極1にて酸化させ、そのときの反応電流を測定する。この時作用極1と参照極3との間の電圧を制御して印加する電圧は、上記工程4の休止時間で設定した0V~-0.7Vの電圧から、過酸化水素が酸化される電圧である0.6V~-0.75Vを印加する。昇圧後、この酸化電圧を例えば2~10秒間保持する。この時、作用極1と対極2との

間の電流は急激な減衰を示した後、緩やかな減衰傾向を示す。これは、測定電流には、被検液や酵素膜等に存在する電解質及び電極構造と酵素膜等に依存して形成される電氣的容量成分から電気回路的に発生する電流が重畳しており、この電流が一定電圧に保持したことにより、急激に減衰するためである。そこで、反応電流の測定は、この緩やかな電流減衰を示す期間から更に2秒～10秒経過後に行う。これにより、グルコース濃度に依存した電流の測定精度が大きく向上する。

【0029】上記の電圧印加において、反応電流は、電圧／時間のレート（以下、「傾斜電圧レート」と呼ぶ）にほとんど依存することなく、グルコース濃度に依存してある電流値に収束する。図4にこの傾斜電圧のレートを変えたときの電流パターンを示すが、300、600、9000 mV／秒の傾斜電圧のレートによってそれぞれピーク電流値が異なっているものの、印加電圧が一定になった後の電流は、それぞれの傾斜電圧レートによらず、ほぼグルコース濃度に比例した電流値に収束していることが判る。また、この結果から、電極間インピーダンス、特に酵素膜及び血球分離膜の膜質のバラツキに伴う電氣的容量成分の変動があっても、反応電流に依存した一定電流に収束することが推察される。更には、印加電圧を直線的に印加するだけでなく、例えば曲線的に電圧を昇圧させても安定した測定が可能である。これらのことから、本発明によれば、例えばグルコース濃度測定の同時再現性とグルコース濃度の測定精度が向上すると云える。

【0030】そして、この測定電流を反応電流とし、標準試料をもとに作製しておいたグルコース濃度対反応電流値の検量線と対照させることにより、測定血液中のグルコース濃度を求めることができる。上記の工程5までに要する時間は、例えばグルコース濃度を測定する際の血球分離膜及び酵素膜からなる酵素電極を用いると最長でも20秒以内であり、従来の簡易式血糖値測定装置における平均的な所要時間に比べて約半分にまで時間短縮が可能になる。

【0031】尚、上記の休止期間（工程4）及び反応電流測定（工程5）は、図2のスイッチSW1の端子がbの状態にある、電圧制御回路にて行う。

【0032】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に説明する。但し、本発明は以下の実施例に何ら制限されるものではない。

【0033】図1に示すように、ガラスエポキシ基板上に作用極1、対極2及び参照極3を備える3電極構成の酵素電極を作製した。尚、各電極の寸法は、全長が何れも2.5mmであり、幅は作用極1及び対極2は0.6mmで、参照極3は0.3mmとした。また、各電極の間隔は0.15mmとした。

【0034】また、図2に従い測定回路4を作製した。尚、抵抗Rsを1KΩ、抵抗Rpを50KΩ、抵抗Ri

を16.6KΩとし、RaとRbとの分圧比を、Ra：Rb=1：2とした。更に、過酸化水素の酸化電圧として0.7V、傾斜電圧レートを14000mV／秒、工程2の膜膨潤時間を6.8秒、工程3の電気分解を80μAで7.2秒、工程4の休止時間を0.5秒、工程5の反応電流測定開始を酸化電圧に維持後2.9秒となるように、それぞれ設定した。

【0035】上記酵素電極及び測定回路を用い、同時再現性試験を行った。本試験は、標準液及び全血において行った。標準液については、グルコース濃度100mg／dlを用いた。測定は、室内湿度20％環境下で行った。検量線は予め標準液で求めておいた $y=0.0389x+1.1897$ を用いた。また、測定1と測定2は、酵素電極の作製日の異なるものを用いた。その結果、測定1についてn=12、電流平均値=5.66μA、SD（標準偏差）=0.11、電流値のCV％（変動係数）=2.02、およびグルコース濃度換算値のCV％=2.97、また測定2についてn=12、電流平均値=5.81μA、SD（標準偏差）=0.14、電流値のCV％（変動係数）=2.37、およびグルコース濃度換算値のCV％=3.45を得た。グルコース濃度換算値における正確性は、測定1についてグルコース濃度=98.81mg/dl、エラー=-1.19％、測定2についてはグルコース濃度=102.56mg/dl、エラー=+2.56％を得た。

【0036】全血測定は採血後、ヘパリンを添加した全血を35℃環境下で、24時間インキュベートし、グルコース濃度を40mg/dl以下にし、再度、蒸留水により作製したグルコース濃度5000mg／dlのグルコース溶液を添加してほぼ40、100、200、300、400、500mg/dlに調整した。この時、調整用グルコースメータとしてGA-1150（（株）アークレイファクトリー製）を用いた。続いて、このグルコース濃度調整後の全血を用いて検量線を求めた。図5に示す。この時の各グルコース濃度における電流値の同時再現性は、n=5でCV％はすべて3％以下である。また、この検量線を基に濃度換算し、医療施設の検査室で使用されている前記GA-1150との相関性を求めた。図6に結果を示すが、相関係数はR=0.998と極めて高く、この相関係数から簡易型血糖値測定装置としての充分な正確性を持つことがわかる。

【0037】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、測定の正確さや再現性は勿論のこと、測定時間が短縮された反応電流測定方法が提供され、特に簡易式血糖値測定装置において有益となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る酵素電極の一実施形態を示す上面図である。

【図2】本発明に係る酵素電極に接続される測定回路図である。

【図3】本発明に係る反応電流測定方法を示すチャート図である。

【図4】傾斜電圧レートの違いによる電流パターンの変化を示すグラフである。

【図5】実施例において得られた反応電流値と検量線との相関を求めたグラフである。

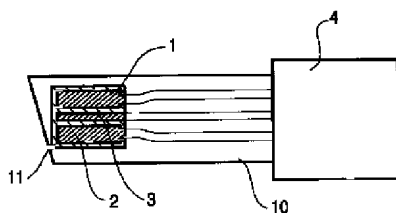
【図6】本発明の測定方法による全血測定の結果と、標準装置（GA-1150）による全血測定の結果との相関を示すグラフである。

【符号の説明】

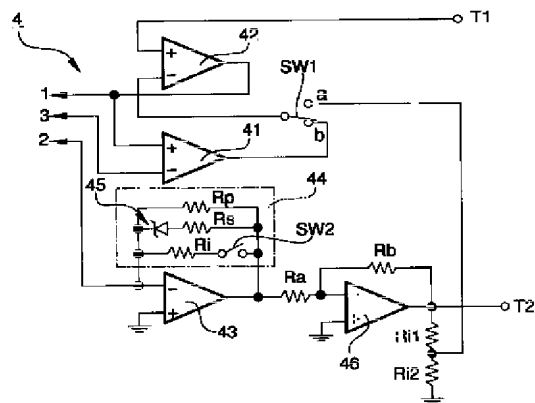
- 1 作用極
- 2 対極

- 3 参照極
- 4 測定回路
- 10 ガラスエポキシ基板
- 11 電極形成部
- 41 電位測定用増幅器
- 42 ボルテージフォロワー型増幅器
- 43 電流測定用増幅器
- 44 フィードバック回路
- 45 ツェナーダイオード
- 46 反転増幅器

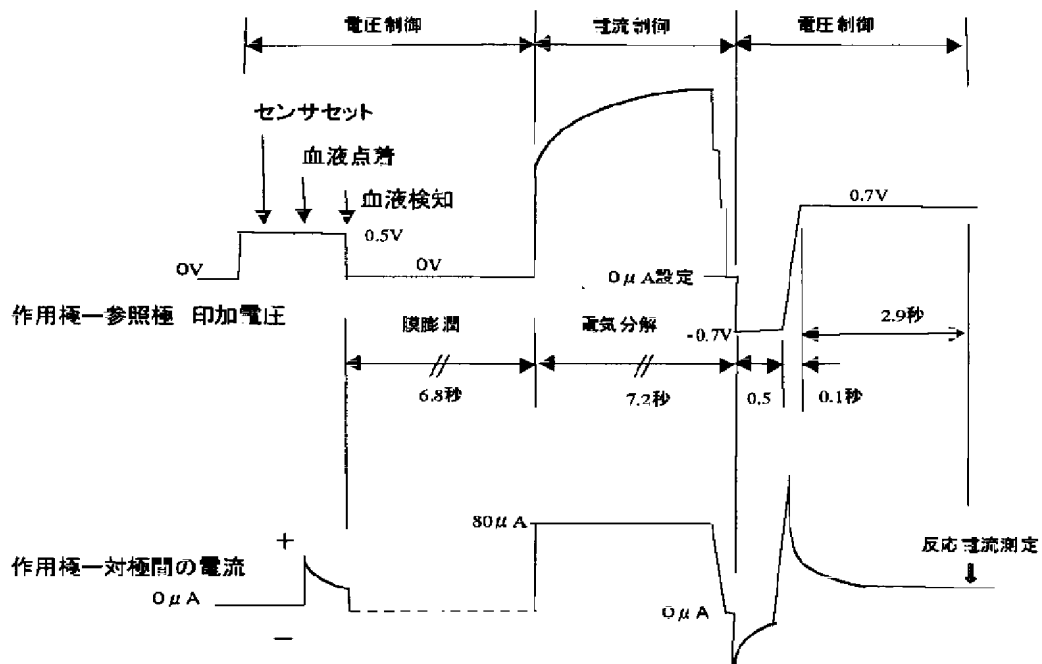
【図1】



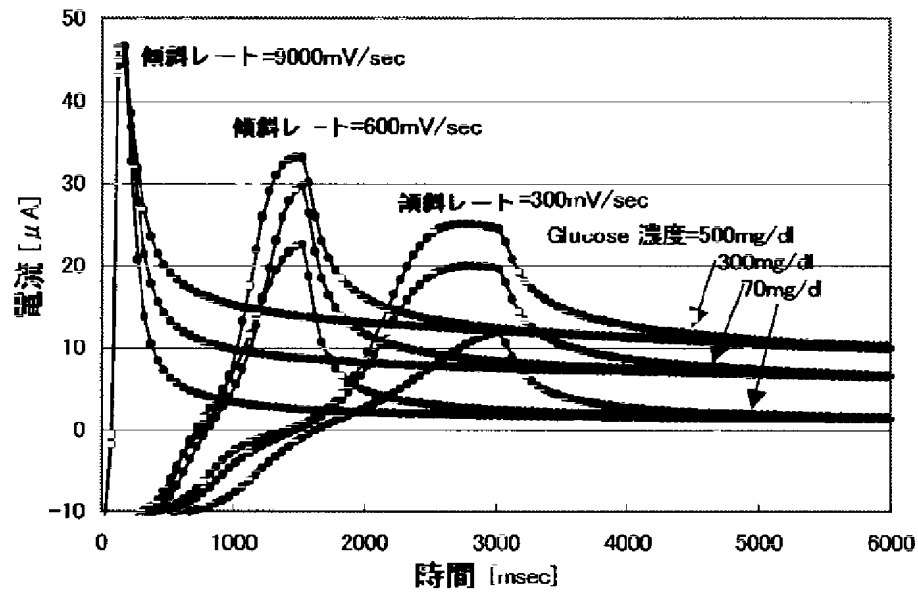
【図2】



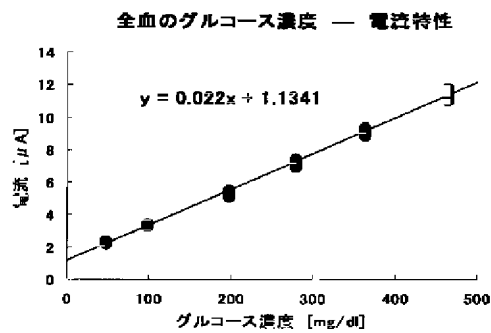
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

